

Hand PCT 21 JAN 2005



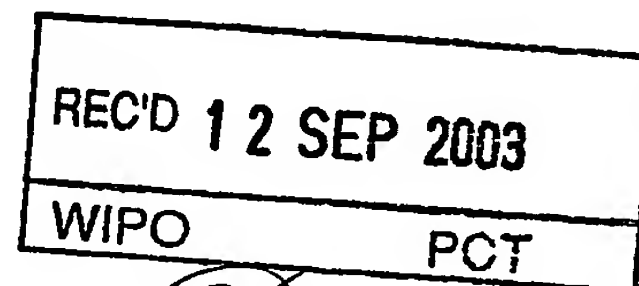
Office de la propriété  
intellectuelle  
du Canada

Un organisme  
d'Industrie Canada

Canadian  
Intellectual Property  
Office

An Agency of  
Industry Canada

PCT/CA 03/01100  
25 AUGUST 2003 25.08.03



*Bureau canadien  
des brevets*  
Certification

*Canadian Patent  
Office*  
Certification

La présente atteste que les documents  
ci-joints, dont la liste figure ci-dessous,  
sont des copies authentiques des docu-  
ments déposés au Bureau des brevets.

This is to certify that the documents  
attached hereto and identified below are  
true copies of the documents on file in  
the Patent Office.

Mémoire descriptif de la demande de brevet no: 2,395,622, tels que déposés,  
le 22 juillet 2002, par UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE, cessionnaire de Réjean  
Tremblay, Fabrice Pernet et Edwin Bourget, ayant pour titre: "Procédé d'Enrichissement  
en Lipides et en Acides Gras Oméga-3 dans les Cultures d'Algues".

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

*Tracey Bucklin*  
Agent certificateur/Certifying Officer

25 août 2003

Date

Canada

(CIPO 68)  
04-09-02

OPIC  CIPO

**ABRÉGÉ DE L'INVENTION**

La présente invention concerne un procédé de culture adapté à de nombreuses espèces d'algues en système semi-continu. Ce système et cette technique d'élevage en milieu contrôlé optimisent les concentrations d'algues tout en permettant un enrichissement en acides gras, spécialement en omega-3. Juste à la fin de l'atteinte de la phase de croissance exponentielle les cultures d'algues subissent un stress environnemental contrôlé entraînant une modification des processus métaboliques. Sous l'influence de ce stress les algues cessent de se diviser pour emmagasiner des lipides sous la forme d'acide gras polyinsaturés et particulièrement d'omega-3.

## PROCÉDE D'ENRICHISSEMENT EN LIPIDES ET EN ACIDES GRAS OMEGA-3, DANS LES CULTURES D'ALGUES

### INFORMATION DE BASE

#### (a) Champs d'application

La présente invention concerne un nouveau procédé de production d'acide gras polyinsaturés et particulièrement d'oméga-3.

#### (b) Art antérieur

Les microalgues, particulièrement celles cultivées dans un médium marin, sont souvent riches en acide gras polyinsaturés (PUFA = Polyunsaturated fatty acid) dont les deux principaux sont l'EPA (éicosapentaenoic acid) et le DHA (docosahexaenoic acid). Le tableau suivant montre les teneurs en EPA et DHA des différentes espèces de microalgues maintenues dans des conditions d'élevage standard.

	% acide gras	
	EPA	DHA
<b>Chrysophyceae</b>		
<i>Pseudopedinella</i>	27	1
<i>Circosphaera</i>	28	-
<i>Isochrysis</i>	-	15
<b>Xanthophyceae</b>		
<i>Nannochloris</i>	27	-
<b>Bacillariophyceae</b>		
<i>Nitzchia</i>	17	-
<i>Phaedactylum tricornatum</i>	28	-
<b>Rhodophyceae</b>		
<i>Porphyridium cruentum</i>	17	-

---

**Dinophyceae**

<i>Amphidinium carterae</i>	20	24
<i>Ceratium furca</i>	7	21
<i>Cochlodinium spp.</i>	11	28
<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	-	30
<i>Gonyaulax spp.</i>	12-34	1-16
<i>Peridinium triquetum</i>	19	2
<i>Procentrum spp.</i>	15-32	3-5

---

References: W. Yongmanitchai et O.P. War (1989; *Omega-3 fatty acids : alternative sources of production*; Proc. Biochem 24: 117-125) et J.K. Volkman *et al.* (1989; *Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture*; J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 128: 219-240).

La culture des microalgues dans le but de produire des PUFAs s'est développée en utilisant les espèces les plus riches en acide gras, tel *Cryptothecodinium cohnii*.

Il est reconnu que les contenus en lipides des microalgues, dont les PUFAs, varient selon les conditions de culture. Cependant les conditions optimisant les concentrations en acide gras dans les algues sont incompatibles avec celles favorisant la croissance des cultures algales. Il en résulte que les cultures d'algues enrichies en lipides, tels les acides gras, sont réalisées seulement à faible concentration diminuant ainsi l'avantage de modifier les conditions de culture.

### **SOMMAIRE DE L'INVENTION**

Le but de la présente invention est de fournir un nouveau procédé de production des PUFAs par l'induction d'un blocage de la division cellulaire. Ce blocage est induit lorsque les cultures ont atteint une concentration optimale (plus de  $10 \times 10^6$  cellules par ml). Cela permet

3

d'obtenir des cellules riches en PUFA, particulièrement en acide gras omega-3.

Selon cette invention différentes espèces d'algues peuvent subir une modification des processus métaboliques menant ainsi à une augmentation significative de la teneur en PUFAs.

### **DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION**

Selon la présente invention les algues sont cultivées en système semi-continu à une température de 18 à 20°C, un pH de 7.5 à 8.0 et une illumination provenant d'un côté fournie par des fluorescents de type *Cool-white™* et *Growlite™* à une intensité de 60 à 250  $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ . La photopériode comprend un cycle de 16h lumière: 8h obscurité. L'eau pour les élevages est filtrée à 1  $\mu\text{m}$  et pasteurisée à 80°C.

À titre d'essai, 2-3 ml de souches mères d'algues sont ajoutés aux erlenmeyers de 125 ml contenant 75 ml de milieu de culture f/2 (R. Guillard, 1975; *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of marine invertebrates animals*. Plenum Press, New York, pp. 29-60). Sept jours après l'inoculation, le contenu des erlenmeyers de 125 ml est transféré dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 300 ml de milieu de culture f/2. Cinq jours plus tard le contenu des erlenmeyers de 500 ml est transvidé dans des contenants de 20 litres. Durant les phases de culture de 125 et 500 ml aucun élément n'est ajouté aux cultures.

Dans les 20 litres, 8 ml de milieu de culture f/2 sont ajoutés avec 18 litres d'eau. Après 2 jours, 4 ml de silicate sont ajoutés et après 3 jours de plus les 20 litres sont transvidés dans des tubes de 170 litres de 7 pieds de hauteur. 62 ml de milieu de culture f/2 et 31 ml de silicate sont ajoutés et les tubes sont remplis d'eau. Les éléments nutritifs avec ou sans silicate, selon l'espèce, sont ajoutés tous les 2 jours. Dans les contenants de 20 et

4

170 litres, de l'air filtrée et du gaz carbonique à un débit de 0.2 à 0.3 l/min sont ajoutés.

Après 6-7 jours d'incubation dans les tubes de 170 litres, les cultures algales ont presque terminé leur croissance exponentielle et atteint leur niveau maximum. C'est à ce moment que les stress en éléments nutritifs sont imposés afin de modifier leur patron métabolique. Les algues cessent de se diviser et commencent à emmagasiner des lipides, surtout sous forme de PUFAs. Le stress nutritionnel ou environnemental imposé dépend de l'espèce en élevage. Pour certaines espèces les concentrations en PUFAs ont été presque doublées pour des concentrations algales identiques.

La présente invention sera plus facile à comprendre en utilisant les exemples suivants qui servent à illustrer l'invention sans limiter sa portée.

#### **Exemple 1**

La diatomée *Chaetoceros gracilis* a été cultivée en système semi-continu de 170 litres à des concentrations de plus de 10 millions de cellules / ml. Des tubes ont continué à être alimentés avec des éléments nutritifs complets tandis que d'autres furent privés de silicates. Les résultats décrit ci-dessous présentent la distribution des acides gras selon le traitement.

	5	
	Avec silicate	Sans silicate
	%	%
20 :5n3	8.9	30.2
22 :6n3	3.9	8.5
Somme PUFA	33.1	50.0
Somme n3	21.1	34.9

L'analyse faite 7 jours après l'application de stress

### Exemple 2

La diatomée *Skeletonema costatum* a été cultivée en système semi-continu de 170 litres. Des tubes ont continué à être alimentés avec des éléments nutritifs complets tandis que d'autres furent privés de silicates. Les résultats présentent la distribution des acides gras selon le traitement.

	Avec silicate	Sans silicate
	%	%
20 :5n3	16.1	37.6
22 :6n3	5.5	7.54
Somme PUFA	41.0	59.9
Somme n3	24.6	42.0

L'analyse faite 7 jours après l'application de stress

L'illustration en haut devrait servir comme démonstratives au lieu de restrictives de l'invention.

Tandis que l'invention a été décrite en rapport avec des réalisations particulières, diverses modifications peuvent être effectués. La présente invention comprend donc toutes variations, emplois, ou adaptations de l'invention qui précèdent. D'une façon générale, sont

6

également compris dans la présente invention, les principes de l'invention incluant tout écart de la présente divulgation connu dans la pratique ordinaire au sein de l'art propre au champs de l'invention qui appliquent les caractéristiques décrites précédemment et celles revendiqués ci-dessous.



**REVENDEICATIONS:**

1. Un procédé de production d'acides gras polyinsaturés (PUFA= Polyunsaturated fatty acid) comprenant les étapes de:
  - a) culture d'algues en un temps suffisant pour atteindre la phase stationnaire de croissance; et
  - b) application d'au moins un facteur limitant la croissance causant ainsi la production et l'accumulation de PUFA.
2. Le procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le facteur limitant la croissance est une absence ou une faible teneur de silicate.
3. Le procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le facteur limitant la croissance est une carence d'éléments nutritifs.
3. Le procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que plusieurs facteurs limitant la croissance sont appliqués en séquence.
4. Un procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'algue est la diatomée *Chaetoceros gracilis* et le facteur de stress est l'absence ou la faible teneur de silicate.
5. Un procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'algue est la diatomée *Skeletonema costatum* et le facteur de stress est la carence en silicate.